

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук,  
Куликова Александра Викторовича,  
на диссертацию Рашупкина Ивана Михайловича  
«Нейрорегуляторные и противовоспалительные эффекты секреторных  
продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*», представленную на  
соискание учёной степени кандидата медицинских наук  
по специальности: 3.2.7. Иммунология.

Актуальность. Нейрорегенерация – ключевой фактор пластичности нервной системы и ее адаптации к меняющимся и часто неблагоприятным внешним условиям, травмам и возрастным изменениям мозга. Нарушения процесса нейрорегенерации приводит к тяжелым нервным и психическим болезням. Согласно общепризнанной гипотезе Р. Дьюмана, депрессия связана с нейродегенерацией, тогда как антидепрессанты активируют процессы нейрорегенерации.

Не вызывает сомнения тесная связь между депрессией, нейродегенерацией и иммунной системой. Эта связь постулируется в кинурениновой гипотезе И.П. Лапина, Б. Леонарда и цитокиновой гипотезе Р. Данзера. Все эти гипотезы считают нейровоспаление как одну из важнейших причин депрессии.

Гуморальные факторы, цитокины, факторы роста, секретируемые клетками микроглии и макрофагами мозга, играют ключевую роль в пластичности нервной системы: с одной стороны, провоспалительные факторы разрушают нежелательные элементы нервной системы, с другой стороны, противовоспалительные и трофические факторы восстанавливают поврежденные нейроны и усиливают нейрогенез и дифференциацию НСК. Важным свойством макрофагов является их способность в зависимости от условий и окружения переключаться на секрецию провоспалительных (M1) и противовоспалительных (M2) факторов. Более того, имеется простой и воспроизводимый алгоритм изменения секреторного типа макрофага. Возникает заманчивый вопрос: можно ли вылечить или облегчить депрессию через активацию противовоспалительных макрофагов.

Работа Ивана Михайловича посвящена актуальному, практически важному, но еще мало изученному вопросу использования секреторных факторов макрофагов для коррекции депрессивноподобных расстройств.

Структура диссертационной работы. Диссертация Рашупкина И.М. представлена на 142 страницах, написана по классическому плану, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Работа



иллюстрирована 18 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 272 источника, большая часть из которых достаточно современные, что свидетельствует об актуальности темы проведенного исследования.

Во введении автор обосновывает актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, ясно формулирует цель и задачи, необходимые для выполнения поставленной цели.

В главе «Обзор литературы» автор подробно характеризует известные на данный момент фенотипы макрофагов и отмечает, что разнообразие этих клеток, вероятно, значительно шире, говоря о малоизученных фенотипах и роли эффероцитоза в механизме M2-поляризации макрофагов. Приводятся данные о роли резидентной микроглии и рекрутированных из периферического кровотока макрофагов в физиологических условиях и при патологии. Далее автор достаточно подробно описывает процессы внутриклеточной и клеточной нейрорегенерации и подходы к её изучению *in vitro* и *in vivo*. Поскольку часть работы, выполненная *in vivo*, проведена на мышах со стресс-индуцированным депрессивноподобным состоянием, автор в обзоре литературы характеризует основные гипотезы формирования депрессивного расстройства. Следует, однако, отметить отсутствие ссылок на более ранние работы И.П. Лапина, Б. Леонарда, Р. Данзера и Р. Дьюмана, в которых и были сформулированы эти гипотезы. Завершается данная глава характеристикой изучаемых в мире подходов к применению макрофагов и их продуктов в терапии нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний. Обзор информативен, логичен и читается легко. Следует особо отметить как достоинство, что все его разделы имеют непосредственное отношение к исследованию и служат его обоснованием.

Глава «Материалы и методы» включает достаточно подробные и иллюстрированные схемы проведенных в ходе работы экспериментов. Охарактеризована генерация макрофагов: M1, M2a и поляризованных эффероцитозом M2(LS). Описаны методы, применяемые для оценки свойств клеток SH-SY5Y *in vitro*: радиометрический метод, морфометрия, проточная цитометрия. Детально изложена модель формирования у мышей стресс-индуцированного депрессивноподобного состояния, применяемая в исследовании. Описаны методы оценки поведенческого паттерна мышей. Охарактеризованы используемые подходы к определению уровня провоспалительных цитокинов (иммуноферментный анализ), нейрональной плотности и уровня экспрессии Iba-1 (иммуногистохимический метод) в различных зонах головного мозга. Следует отметить, что при анализе гистологического материала Иван Михайлович заменил традиционный подсчет числа клеток и их размеров интегральным показателем – оптической



плотностью. Такой методический прием следует рассматривать как оригинальное решение трудной проблемы, которое сохраняя точность и объективность параметра значительно упрощает его оценку.

Глава «Результаты» состоит из пяти разделов, первые три из которых посвящены результатам экспериментов *in vitro* и включают данные о влиянии кондиционных сред от различно активированных макрофагов (M1, M2a, M2(LS)) на свойства НСК-подобных клеток SH-SY5Y в условиях повреждения последних (гипоксия, депривация сыворотки). Три раздела посвящены, последовательно, исследованию пролиферации, жизнеспособности и дифференцировки нейральных предшественников. Данные разделы иллюстрированы достаточным количеством графиков, в разделе, посвященном дифференцировке, приведены три таблицы. Разделы 4 и 5 посвящены изучению свойств секреторного продукта M2(LS) макрофагов, показавшего наибольшую нейрорегуляторную активность *in vitro*, в модели стресс-индуцированной депрессии при курсовом интраназальном введении мышам. Охарактеризовано влияние M2(LS) на поведенческие характеристики, экспрессию провоспалительных цитокинов, уровень активации микроглии (по маркеру Iba-1) и нейрональную плотность в различных церебральных структурах экспериментальных животных. Все результаты статистически обоснованы и сомнения не вызывают. Следует заметить, что Иван Михайлович везде использует двусторонние критерии и порог  $p < 0.05$ . Поэтому он рассматривает значения  $0.1 < p > 0.05$  как тенденции. Поскольку в его исследованиях проверяются в основном односторонние гипотезы, постулирующие, что повреждающие воздействия ухудшают, а факторы макрофагов улучшают оцениваемые показатели, автор вправе использовать односторонние критерии и порог  $p < 0.1$ . В этом случае тенденции превращаются в строгие статистические доказательства. Иван Михайлович повсеместно использует непараметрические критерии, которые менее чувствительны по сравнению с параметрическими. Непонятно чем обусловлен отказ от использования параметрических критериев.

Глава «Обсуждение полученных результатов» содержит комплексное рассмотрение полученных данных с их концептуальным осмыслением в свете современных теоретических представлений. Иван Михайлович дает логичное объяснение нейропротекторных эффектов продуктов M1 и M2a, а так же почему их эффекты слабее, чем эффекты продуктов M2(LS). Особый интерес представляет идея, которую Иван Михайлович развивает в обсуждении об усилении нейропротекторного эффекта в результате возможного взаимодействия различных факторов в их смеси.



Заключение представляет собой краткий итог работы с кратким пересказом основных полученных результатов.

Выводы 1-5 соответствуют результатам работы и логично вытекают из целей, поставленных автором исследования, тогда как вывод 6 является, скорее, обобщающим.

Научная новизна исследования. Работа представляет принципиально новые данные о нейрорегуляторных свойствах различных фенотипов GM-CSF-дифференцированных макрофагов человека. Показано стимулирующее воздействие секреторных продуктов M1( $\text{IFN}\gamma$ ), M2a(IL-4) и поляризованных эффероцитозом M2(LS) на пролиферацию и дифференцировку нейрональных предшественников линии SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и воздействия гипоксии. Особый научный интерес представляет выявленная уникальная способность секреторного продукта макрофагов с M2(LS) фенотипом поддерживать жизнеспособность нейральных клеток при комбинированном повреждении (депривация и гипоксия), а также более выраженный в сравнении с M1 и M2a макрофагами стимулирующий эффект на пролиферацию и дифференцировку в условиях длительного комбинированного повреждения. Новыми являются данные об эффектах курсового интраназального введения растворимых факторов M2(LS) мышам со стресс-индуцированной депрессией. Продемонстрированные в исследовании коррекция поведенческого паттерна, повышение нейрональной плотности и снижение уровня маркеров воспаления в головном мозге мышей свидетельствуют о антидепрессантном, противовоспалительном и нейрорегенеративном эффектах секреторных продуктов M2(LS).

Теоретическая и практическая значимость. Настоящее исследование вносит существенный вклад в теоретические представления о нейрорегенераторных свойствах различных фенотипов макрофагов, детально характеризуя влияние их секреторных продуктов на функции нейральных клеток-предшественников в условиях гипоксического стресса и депривации сыворотки. Значимыми являются данные о выраженном нейрорегенеративном эффекте секреторного продукта M2(LS) макрофагов в условиях длительного комбинированного повреждения клеток SH-SY5Y. Исследование влияния интраназального введения растворимых факторов M2(LS) макрофагов в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей демонстрирует сопряженность противовоспалительного эффекта M2(LS) с повышением нейрональной плотности и коррекцией поведенческого паттерна животных. С практической точки зрения, выявленные нейрорегуляторные и противовоспалительные свойства макрофагов создают научную основу для разработки инновационных терапевтических стратегий при психоневрологических заболеваниях,



связанных с нейродегенерацией, нейровоспалением и нарушением нейрональной пластичности.

Степень достоверности полученных результатов, выводов и положений, выносимых на защиту. Диссертационная работа Ращупкина И.М. представляет собой завершенное научное исследование, выполненное в соответствии с современными методологическими стандартами. Достоверность и научная обоснованность полученных результатов обеспечивается комплексным подходом, сочетающим экспериментальные модели *in vitro* и *in vivo*, применением современных высокочувствительных иммунологических методик и использованием сертифицированного лабораторного оборудования. Все этапы исследования, от постановки задач до интерпретации данных, характеризуются методологической строгостью, что подтверждается корректной статистической обработкой результатов и полной верификацией выдвигаемых положений. Сформулированные выводы объективно отражают полученные экспериментальные данные и демонстрируют значимость проведенного исследования для развития данного научного направления.

Замечания оппонента. 1. Какой диаметр сосуда в тесте «принудительное плавание» (раздел 2.6).

2. Хотелось бы услышать подробности протокола теста на ангедонию (раздел 2.6).

3. Почему автор не использовал более чувствительные параметрические критерии там, где они допустимы.

4. Автор использует малопонятные термины «депрессивноподобные мыши», «витральный» и т.п.

5. Оценить эффективность интраназального введения продуктов M2(LS) по сравнению с классическими антидепрессантами.

6. Кроме того, хотелось бы знать мнение автора на эффективность растворимых продуктов M2(LS) по сравнению с классическими антидепрессантами и на клинические перспективы использования растворимых их для лечения депрессивных расстройств, резистентных к классическим антидепрессантам. Это замечание является дискуссионным.

Заключение. Диссертационная работа Ращупкина Ивана Михайловича «Нейрорегуляторные и противовоспалительные эффекты секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7.

Иммунология», является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на достаточно высоком методическом уровне и посвященной решению актуальной для современной

иммунологии научной задачи – характеристике нейрорегуляторных эффектов секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости полученных результатов, диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями от 16.10.2024 г., № 1382), а её автор Ращупкин И.М. заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных в работе диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии Российской академии наук»

Заведующий сектором генетических коллекций нейропатологий  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук», главный научный  
сотрудник, доктор биологических наук  
Куликов Александр Викторович



06.05.2025

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

Тел.: +7 (383) 363-49-80; факс: +7 (383) 333-12-78

E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)

Сайт: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Подпись заведующего сектором, д.б.н. Куликова А.В. ЗАВЕРЯЮ  
ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н. Орлова Г.В.



07.05.2025